

炭球菌素及其衍生物，它们的制备方法， 含它们的药物组合物和用途

发明领域

本发明涉及炭球菌素（Concentricolide）及其衍生物，该化合物及其衍生物的制备方法，含有炭球菌素或其衍生物的药物组合物以及该化合物及其衍生物在治疗和预防人类免疫缺陷病毒（HIV）感染方面的应用。

背景技术

轮层炭壳属真菌（*Daldinia* sp.）和其他的炭角菌科（Xylariaceae）真菌均富含独特的次生代谢产物。早在二十世纪中期，Allport 和 Bu'Lock 就对欧洲的 *Daldinia* sp. 进行了化学成分的研究(D.C. Allport, J.D. Bulock, *J. Chem. Soc.*, 1958, 4090; D.C. Allport, J.D. Bulock, *J. Chem. Soc.*, 1960, 654.), Anke 等对美洲的该属真菌做了研究(H. Anke, M. Stadler, A. Mayer, O. Stern, *Can. J. Bot.*, 1995, 73, 802), 从中发现了该属真菌特征的代谢产物。最近，日本科学家 Asakawa 等研究了产自日本的两种 *Daldinia* sp. (M. Stadler, H. Wollweber, A. Muhlbauer, T. Henkel, Y. Asakawa, T. Hashimoto, Y. M. Ju, J. D. Rogers, H. G. Wetzstein, H. W. Tichy, *Mycotaxon* 2001, 77, 379; M. S. Buchanan, T. Hashimoto, S. Takaoka, et al., *Phytochemistry* 1996, 42, 173; D. N. Quang, T. Hashimoto, M. Tanaka, M. Baumgartner, M. Stadler, Y. Asakawa. *Phytochemistry* 2002, 61, 345; M. Buchanan, T. Hashimoto, and Y. Asakawa, *Phytochemistry* 1995, 40, 135; M. S. Buchanan, T. Hashimoto, and Y. Asakawa, *Phytochemistry* 1996, 41, 821.5-9), 从中又发现了 20

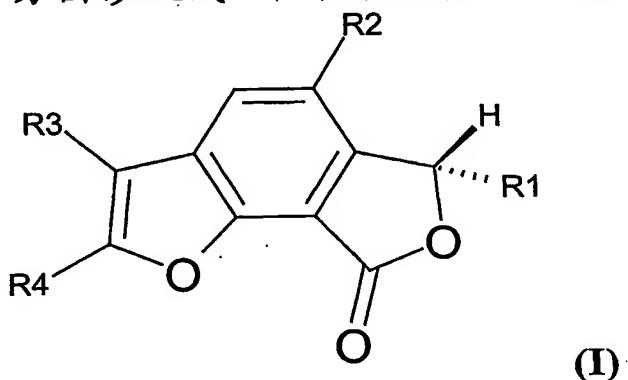
多个新化合物，其中一些化合物显示了包括抗微生物和杀虫在内的广泛的生物活性。

发明内容

本发明人现从中国云南丽江的炭球菌 (*Daldinia concentrica*) 中发现了具有苯并呋喃内酯骨架的新化合物并命名为炭球菌素 A (concentricolide A)。

该炭球菌素显示了较强的阻断融合活性，其可以阻止 HIV 病毒进入正常细胞，抑制 HIV 病毒复制，并且可以减缓人体免疫系统被损害的速度。因此，该炭球菌素可用于预防和/或治疗 HIV 感染。

本发明第一方面涉及式 I 化合物或其衍生物，



其中，

R1 代表 C₁-C₄ 烷基，

R2 代表 H、卤素、-OH、NRR' 或 -NO₂，其中 R 和 R' 代表 H、或 C₁-C₆ 烷基，

R3 代表 H、卤素、-OH、NRR' 或 -NO₂，其中 R 和 R' 代表 H、或 C₁-C₆ 烷基，

R4 代表 H、卤素或 -NO₂。

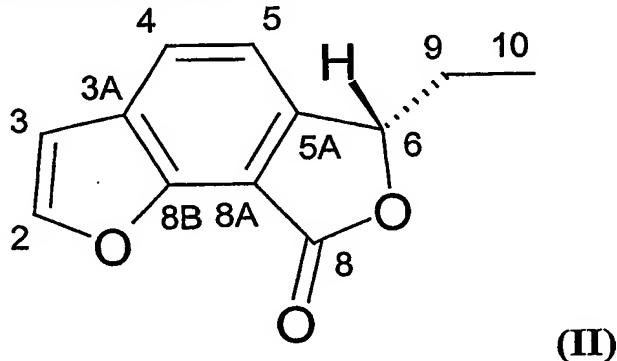
本发明再一方面涉及一种药物组合物，其含有作为活性成份

的式 I 化合物或其衍生物及药用载体或赋形剂。

本发明还涉及制备式 I 化合物或其衍生物的方法，其包括：

a.以云南高等真菌炭球菌 (*Daldinia concentrica*) 子实体或其发酵液为原料，用有机溶剂提取；

b.将 a 中提取物用硅胶柱层析分离，得式 II 化合物；

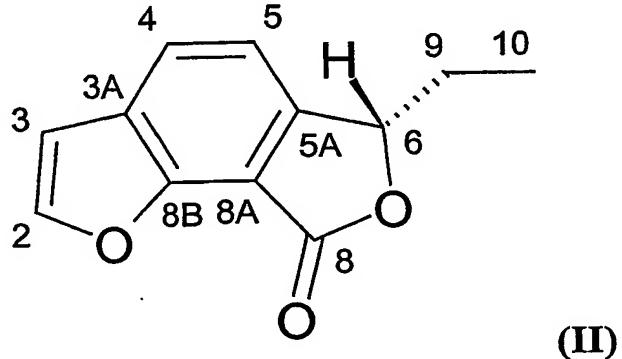


c.将式 III 化合物通过溴化，硝基化或烷基化反应，得式 I 化合物。

本发明还涉及式 I 化合物在制备用于预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的药物中用途。

本发明进一步涉及预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的方法，其包括将式 I 化合物或其衍生物给予 HIV 感染者。

本发明还涉及云南高等真菌炭球菌 (*Daldinia concentrica*) 的提取物，其特征在于，该提取物含有式 II 化合物。

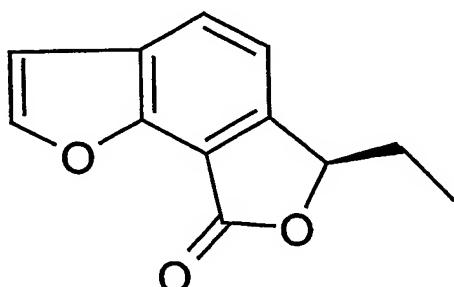


本发明还涉及含有炭球菌提取物及药用载体或赋形剂的药物

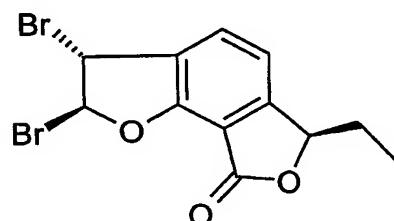
组合物，其中炭球菌提取物含有式 II 炭球菌素。

本发明还涉及炭球菌提取物在制备用于预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的产物中用途。

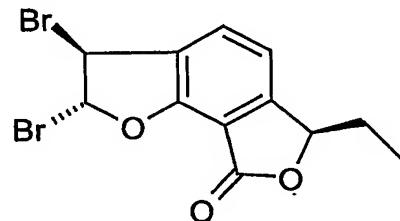
根据本发明，本发明的式 I 化合物或其衍生物优选下面通式代表的化合物：



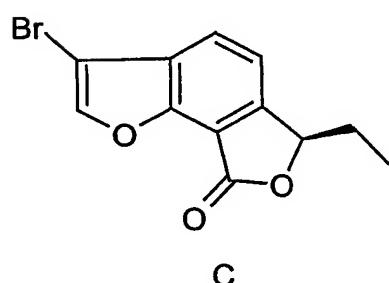
(II)



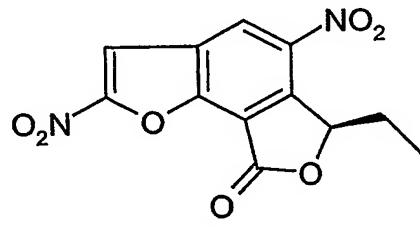
B1



B2



C



D

更优选式 II 化合物。

根据本发明，本发明的式 I 化合物或其衍生物包括其各种光学立体异构体，优选式 II 所示的立体异构体。

根据本发明，术语“式 I 化合物的衍生物”通常可是式 I 化合物的药用盐，立体异构体，水合物或溶剂化物。

根据本发明，本发明所涉及化合物可以与多种有机或无机酸形成盐，其包括药物化学中常用的生理学上可接受的盐，这类盐也包括在本发明中。用于成盐的常用无机酸举例有：盐酸、硝酸、硫酸、磷酸等等。常用的有机酸举例有：一元和二元脂肪酸、苯基烷基酸、羟基烷基酸、羟基烷基二酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等等。常见的盐有：乙酸盐、苯乙酸盐、三氟乙酸盐、丙烯酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、氯取代苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、O-乙酰氧基苯甲酸盐、奈基苯甲酸盐、溴化物、异丁酸盐、苯基丁酸盐、 β -羟基丁酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,4-二酸盐、己酸盐、辛酸盐、氯化物、桂皮酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐、富马酸盐、羟乙酸盐、庚酸盐、马尿酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、羟基马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐；异烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、丙炔酸盐、丙酸盐、苯丙酸盐、水杨酸盐、癸二酸盐、琥珀酸盐、硫酸一氢盐、焦硫酸盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磺酸盐、苯磺酸盐、对溴苯磺酸盐、氯苯磺酸盐、乙烷磺酸盐 2-羟基乙烷磺酸盐、甲烷磺酸盐、1-萘磺酸盐、2-萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、二甲苯磺酸盐、酒石酸盐等等，最适为盐酸盐。

根据本发明，式 II 化合物可以轮层炭壳属真菌 (*Daldinia* sp.) 为原料。粉碎后的 *Daldinia* sp. 用有机溶剂（例如：甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、乙醚、甲基异丁基醚、四氢呋喃、乙腈等）充分提取，提取液浓缩后用固相载体吸附。固相载体包括磨碎的天然矿石（如：高岭土、粘土、滑石、白垩、石英、蒙脱土）和人工材料（如：二氧化硅、氧化铝、硅酸盐）或吸附树脂（如：酚醛树脂、聚酰胺树脂）。吸附后的提取物用

极性递增的混合溶剂进行梯度洗脱，洗脱液浓缩后用硅胶柱进一步纯化。

或者，式 II 化合物可如下得到：以轮层炭壳属真菌 (*Daldinia* sp.) 发酵培养液为原料。发酵液用有机溶剂（例如：乙酸乙脂、乙醚、氯仿、二氯甲烷、丁醇）充分提取，提取液浓缩后用固相载体吸附。固相载体包括磨碎的天然矿石（如：高岭土、粘土、滑石、白垩、石英、蒙脱土）人工材料（如：二氧化硅、氧化铝、硅酸盐）或吸附树脂（如：酚醛树脂、聚酰胺树脂）。吸附后的提取物进行梯度洗脱，洗脱液浓缩后用硅胶柱进一步纯化得到。

根据本发明，式 (I) 或式 (II) 化合物可用于治疗人类免疫缺损病毒 (HIV) 感染引起的获得性免疫缺损症 (AIDS)。该类化合物可以从真菌中直接分离得到，或者通过全合成或半合成获得。本发明所有化合物在用于治疗人类免疫缺损病毒 (HIV) 感染时，可以单独使用或以药物组合物形式应用。本发明还涉及 *Daldinia* sp. 提取物在治疗人类免疫缺损病毒 (HIV) 感染中的应用。该提取物中包含 (II) 化合物，该提取物还可以与其它用于治疗 HIV 的化合物或处方配合使用。

进一步讲，*Daldinia* sp. 提取物可以用上述有机溶剂提取的常规操作获得，不同纯度提取物均可使用。式 (II) 化合物在提取物中的含量为 0.01-2 重量%，通常为 0.1-1 重量%。

本发明还涉及轮层炭壳属真菌 (*Daldinia* sp.) 在治疗人类免疫缺损病毒 (HIV) 感染中的应用，可以是粉碎的子实体或培养发酵物。粉碎的真菌可以与其它用于治疗 HIV 的化合物或处方配合使用。

将一个或多个式 (I) 或 (II) 化合物与赋形剂、稀释剂、载

体共同压成片剂，或其它口服剂型，还可以制成肌肉注射或静脉注射药物，也可以制成缓释剂型药物。

药物剂型采用已知工艺制备。更具体讲，本发明所涉及化合物可与常规赋形剂、稀释剂、载体一起制成片剂、胶囊、悬浮液、粉剂等等。常用的赋形剂、稀释剂和载体举例讲为填料和膨胀剂（如：淀粉、糖、甘露糖醇、硅酸衍生物）、粘合剂（如：羧甲基纤维素、其他纤维素衍生物、藻酸盐酰、明胶、聚乙烯吡咯烷）、保湿剂（如：甘油）、缓释剂（如：石蜡）、再吸收促进剂（如：季铵盐）、表面活性剂（如：鲸蜡醇、硬脂酸甘油酯）、吸附载体（如：高岭土、斑脱土）和润滑剂（如：滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态多乙基乙二醇）。

本发明所涉及化合物还可以制成非口服剂型，如：肌肉注射、皮下注射、静脉注射剂型，还可以制成缓释剂型等等，也可以设计药物使其在一段时间内在肠道的特定部位吸收。药物的外壳、包装、保护层可以用聚合材料或蜡制作。

本发明中关于式(I)或(II)化合物在治疗人类免疫缺损病毒(HIV)感染中使用的具体剂量取决于许多因素，如疾病的严重程度、体重、年龄、性别，给药途径，以及临床医生的具体诊断。通常，有效剂量为0.1-1000毫克/人/天，优选剂量为50-200毫克/人/天，可分1-3次用药。

附图说明

图1为炭球菌素A或II对C8166细胞毒性(CC₅₀为76.66 μg/ml);

图 2 为 AZT 对 C8166 细胞毒性(CC₅₀ 为 258.88 μg/ml)；

图 3 为炭球菌素 A 或 II 对 HIV-1 与细胞结合和融合的阻断实验 (EC₅₀ 为 0.83 μg/ml)；

图 4 为 T-20 对 HIV-1 感染细胞融合的阻断实验 (EC₅₀ 为 6.02 ng/ml)；

图 5 为炭球菌素 A 或 II 对 HIV-1 致细胞病变的抑制作用 (EC₅₀ 为 0.31 μg/ml)；

图 6 为 AZT 对 HIV-1 致细胞病变的抑制作用 (EC₅₀ 为 0.092 μg/ml)；

图 7 为本发明的炭球菌素 A 的 X 晶体衍射图。

具体实施方式

下面是实施例用于进一步说明本发明，但其不意味着对本发明的任何限制。

实施例 1 炭球菌素 A 的制备

将干燥并粉碎的炭球菌子实体 (750 克)，用氯仿-甲醇 (1:1 体积) 和甲醇分别与室温下提取三次。有机相合并后于真空条件下旋转蒸干，得到深褐色膏状粗提物 (60 克)。

粗提物用 80-100 目硅胶拌样后进行硅胶柱层析，氯仿-甲醇 (100:0, 95:5, 90:10, 体积比) 依次洗脱，共得 15 个组分。组分 8 (氯仿-甲醇 95:5 洗脱，9 克) 进一步进行硅胶柱层析，石油醚/丙酮 (99:1, 95:5, 90:10, 80:20, 体积比) 依次洗脱。由 99:1 洗脱部分直接得到炭球菌素 A (Concentricolide A) 120 毫克。

或者，将炭球菌 (*Daldinia concentrica*) 子实体发酵液 (80 升) 用乙酸乙酯于室温下提取五次。有机相合并后于真空条件下旋转蒸干，得到深褐色膏状粗提物 (24 克)。粗提物用 80-100 目硅胶拌样后进行硅胶柱层析，氯仿-甲醇 (100:0, 95:5, 90:10,

体积比)依次洗脱,共得15个组分。组分8(氯仿-甲醇95:5洗脱,1.7克)进一步进行硅胶柱层析,石油醚/丙酮(99:1,95:5,90:10,80:20,体积比)依次洗脱,由99:1洗脱部分直接得到炭球菌素(Concentricolide)173毫克。

炭球菌素A(Concentricolide A)理化及波谱数据如下:
浅黄色针状晶体;熔点89~90°C(石油醚/丙酮);旋光 $[\alpha]_D^{21.9} = -59.23^\circ$ (c 0.48, MeOH)。EI-MS m/z (rel. int.): 202 [M]⁺(20), 173(100), 145(48); HR-TOF-MS m/z : 225.0526 ([M+Na]⁺, 225.0527 理论值 C₁₂H₁₀O₃Na)。UV(MeOH) λ_{max} nm: 226 (log ε 4.08), 256.5(3.88), 297(3.63)。IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1757, 1641, 1534, 1437。
炭球菌素的¹H- 和¹³C-NMR 数据(500 MHz, CD₃OD, δ in ppm, J in Hz)

	δ (C)(DEPT)	Δ (H)	¹ H- ¹ H COSY	HMBC (selected)
CH(2)	146.4(CH)	7.74(1H, d, $J=2.2$)	H-3	H-3
CH(3)	106.6(CH)	6.86(1H, d, $J=2.2$)	H-2	H-2, 4
C (3A)	128.9(C)			H-2, 5
CH(4)	127.8(CH)	7.86(1H, d, $J=8.3$)	H-5	H-3
CH(5)	116.0(CH)	7.24(1H, d, $J=8.3$)	H-4	
C(5A)	147.8(C)			H-4, 9
CH(6)	82.9(CH)	5.52(1H, dd, $J=7.1,4.1$)	H-9a	H-5, 9, 10
C(8A)	110.9(C)			H-5, 6
C(8B)	149.6(C)			H-2, 3, 4
CH ₂ (9)	27.8(CH ₂)	1.81(1H,m) 2.13(1H, m)	H-6, 9b, 10 H-9a, 10	H-6, 10
CH ₃ (10)	8.7(CH ₃)	0.95 (3H, t, $J=7.2$)	H-9a, 9b	H-6, 9
C(8)	168.9(C)			H-6

X 衍射分析结果：

$C_{12}H_{10}O_3$, M 202, 属三斜晶系, 空间群为 P1, 晶胞参数: $a=7.728(1)$, $b=8.289(1)$, $c=9.043(1)$ Å, $\alpha=106.450(5)^\circ$, $\beta=96.321(6)^\circ$, $\gamma=108.946(6)^\circ$ 。晶胞体积 $V=512.36(3)$ Å³, 晶胞内分子数 $Z=2$ 。最终可靠因子 $R_f=0.073$, $R_w=0.066$ ($w=1/\sigma|F|^2$)。用 MAC DIP-2030K 面探测仪收集衍射强度数据, $MoKa$ 辐射, 独立衍射点为 1369 个。分子结构用 SHELXS86 程序包解析。其 X 晶体衍射图见图 7。

实施例 2

由炭球菌素 A (Concentricolide, A) 制备 2, 3-二溴-2, 3-二氢炭球菌素 (B)

60 mg 炭球菌素 (A, 0.30 mmol) 溶于 2 ml CHCl₃ 中, 65 mg Br₂ (0.41 mmol) 溶于 1 ml CHCl₃ 中, 搅拌状态下将 Br₂ 溶液滴加入 A 的溶液中, 室温条件下保持搅拌 120 小时, 反应产物浓缩后析出浅黄色针晶, 重结晶后得 B 50.8 mg, 产率 47.2%。该产物在 HPLC 上显示两个峰, 鉴定为一对光学异构体 (B₁ 和 B₂)。

炭球菌素 (A) 与 Br₂ 发生加成反应生成 B, 为一浅黄色针状晶体。EI-MS 显示有三个同位素峰: 364、362、360, 其相对丰度约为 1: 2: 1, 显示分子中含有两个 Br 原子。与炭球菌素 A 对比, 两者恰好相差两个 Br 原子的分子量, 进一步证明了两个 Br 原子的存在。在 ¹H-NMR 谱中可以观察到两个相互偶合的双键氢 [δ 7.79 (1H, d, $J=7.7$), 7.19 (1H, d, $J=7.7$)], 根据偶合常数 $J=7.7$, 推测为苯环上的氢, 则 Br₂ 加成反应发生在分子的 2,

3 位上。HMBC 中 $\delta_{\text{H}} 7.79$ 与 C-3, 5A, 8A 相关, $\delta_{\text{H}} 7.19$ 与 C-3A, 4, 5A, 8A 相关, 进一步证实了加成反应发生在呋喃环上。则 B 的结构确定为 2,3-二溴-2,3-二氢炭球菌素。B 的 HPLC 分析显示有两个峰的存在, 因为 Br_2 加成反应为溴鎓离子历程, 两个 Br 原子从相反的方向进攻双键的碳, 其加成反应产物应为一对光学异构体, 即 B 实为一混合物, 两个成分分别为(2S, 3S)-2,3-二溴-2,3-二氢炭球菌素 (\mathbf{B}_1) 和 (2R, 3R)-2,3-二溴-2,3-二氢炭球菌素 (\mathbf{B}_2)。

2,3-二溴-2,3-二氢炭球菌素 (\mathbf{B}_1 和 \mathbf{B}_2)。浅黄针晶 (石油醚/丙酮);

EI-MS m/z (rel. int.): 364 [\mathbf{M}_1^+] (0.5), 362 [\mathbf{M}_2^+] (1.0), 360 [\mathbf{M}_3^+] (0.5), 284 (7), 282 (13), 280 (31), 278 (7), 202 (20), 173 (100), 145 (50), 117 (7), 89 (12);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.79 (1H, d, $J=7.7$), 7.19 (1H, d, $J=7.7$), 7.02 (1H, d, $J=3.8$), 5.79 (1H, d, $J=4.2$), 5.46 (1H, m), 2.14 (1H, m), 1.86 (1H, m), 1.06 (3H, t, $J=7.4$);
 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 166.6, 166.6, 153.9, 153.9, 153.8, 153.8, 131.6, 131.5, 128.1, 128.0, 117.1, 117.1, 112.2, 112.0, 90.1, 90.0, 82.8, 82.8, 50.9, 50.8, 27.8, 27.7, 9.1, 9.0;

实施例 3

由 2,3-二溴-2,3-二氢炭球菌素 (B) 制备 3-溴炭球菌素 (C)

32 mg B (0.09 mmol) 溶于 2ml CH_3OH , 室温搅拌条件下加入 1 ml 饱和了 KOH 的 CH_3OH 溶液。8 小时后, 反应液用

1%的盐酸甲醇溶液中和至 pH 7.0，加少量水稀释，用 CHCl₃ 萃取，萃取液干燥后得粗品。重结晶得 11.8 mg 浅黄色针晶 C，产率 47.5%。

B 发生消去反应生成 C，为一浅黄色针状晶体。质谱显示有两个相对丰度为 1: 1 的同位素峰：282 和 280，表明分子中存在一个 Br 原子。¹H-NMR 中可以观察到三个双键氢的信号 [δ_H 7.84 (1H, d, J=8.0), 7.80 (1H, s), 7.34 (1H, d, J=8.0)]，将其与 A 的信号 [δ_H 7.74 (1H, d, J=2.2, H-2), 6.86 (1H, d, J=2.2, H-3), 7.86 (1H, dd, J=8.3, 3.6, H-4), 7.24 (1H, d, J=8.3, H-5)] 作比较，推测消去的是 H-3。HMBC 显示有 δ_H 7.80 (1H, s) 与 C-3, 3A, 8B 的相关峰，进一步证明了该化合物的结构为 3-溴炭球菌素。

3-溴炭球菌素 (C). 浅黄针晶 (石油醚/丙酮)； m.p. 88~89.5°C； EI-MS *m/z* (rel. int.); 282 [M₁]⁺ (20), 280 [M₂]⁺ (21), 253 [M₁-C₂H₅]⁺ (80), 251 [M₂-C₂H₅]⁺ (100), 225 (52), 223 (68); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 7.84 (1H, d, J=8.0), 7.80 (1H, s), 7.34 (1H, d, J=8.0), 5.56 (1H, m), 2.18 (1H, m), 1.84 (1H, m), 0.99 (3H, t, J=7.4); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.2, 149.5, 149.2, 144.1, 128.8, 126.5, 116.8, 111.6, 98.3, 82.9, 27.8, 8.7; 2D-NMR

实施例 4

由炭球菌素 A(Concentricolide, A)制备 2, 5-二硝基炭球菌素 (D)

50 mg A (0.25 mmol) 溶于 1ml CHCl₃ 中，冷却条件下加入

1.5 ml 浓 H_2SO_4 , 保持搅拌条件下, 滴加入 1 ml 浓 HNO_3 。室温下搅拌 30 分钟, 反应液倾倒入碎冰中, 用 Na_2CO_3 去除多余的酸。混合液加少量水稀释, 用 $CHCl_3$ 萃取, 萃取液干燥后得粗品。重结晶得 31.8 mg 浅黄色针晶 D, 产率 44%。

2, 5-二硝基炭球菌素 (D). 浅黄针晶 (石油醚/丙酮); m.p. 203~205°C; EI-MS m/z (rel. int.): 292 [M]⁺ (25), 263 [M- C_2H_5]⁺ (100); HR-TOF-MS m/z : $C_{12}H_8N_2O_7$ ([M+Na]⁺ 315.0220, cal. for $C_{12}H_8N_2O_7Na$ 315.0229); ¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.98 (1H, s), 7.96 (1H, s), 6.13 (1H, m), 2.29 (1H, m), 1.77 (1H, m), 0.91 (3H, t, $J=7.4$); ¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 163.9, 155.3, 149.7, 147.1, 140.9, 128.2, 126.8, 114.6, 106.9, 84.1, 26.3, 9.1。

下述制剂中, “活性成分”指的是式 (I) 或 (II) 化合物。

实施例 5 明胶胶囊

硬明胶胶囊制备方法如下:

	量 (毫克/胶囊)
活性成分	0.1-1000
淀粉	0-650
可流动淀粉	0-650
硅酮油 (粘度 350 厘司)	0-15

成分混合后过筛, 装入胶囊。

实施例 6 炭球菌素胶囊

组成	量 (毫克/胶囊)
炭球菌素	100
淀粉	100
可流动淀粉	397
硅酮油 (粘度 350 厘司)	3

实施例 7 片剂

组成	量 (毫克/片)
活性成分	0.1-1000
微晶纤维素	0-650
二氧化硅	0-650
硬脂酸	0-15

将上述成分混合后压制成片剂。

有效成分含量 0.1-1000 mg /片的片剂：

实施例 8 片剂

组成	量 (毫克/片)
活性成分	0.1-1000
淀粉	45
晶纤维素	35
聚乙烯吡咯烷酮(10%水溶液)	4
羧甲基纤维素钠	4.5
硬脂酸镁	0.5
滑石粉	1

将有效成分、淀粉、纤维素过筛混合均匀后与聚乙烯吡咯烷酮配成溶液，该溶液过筛以制备药品微粒。药粒子于 50-60° C 干燥后过筛，与过筛后的羧甲基纤维素钠、硬脂酸镁混合均匀后压制成片剂。

有效成分含量 0.1-1000 mg / 5 ml 的悬浮剂制备如下：

实施例 9 悬浮剂

组成	量 (毫克/5 毫升)
活性成分	0.1-1000
羧甲基纤维素钠	50
糖浆	1.25 mg
苯甲酸溶液	0.1 ml
调味剂	q.v.
调色剂	q.v.
加纯水到	5 ml

有效成份过筛后与羧甲基纤维素钠、糖浆混合成均匀糊状。安息香酸溶液、香料和色素在搅拌状态下用水稀释，加入药品糊，再加入足够的水至所需体积。

生物活性实验

材料和方法

药品和试剂

试剂

MTT (3, (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 购自 Amresco 公司； **SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)** 为 Serva 产品； **AZT (3P-azido-3P-deoxythymidine)** 为 Sigma 产品； **DMF (N, N'-Dimethyl formamine)** 购自上海化学试剂公司。

培养基

RPMI-1640 完全培养基，含有 10% 新生小牛血清(Gibco), 2mM-L-Glutamine, 10Mm HEPES, 50 μ M 2-巯基乙醇, 100,000 IU 青霉素, 100 μ g/ml 硫酸链霉素。

化合物

检测化合物为炭球菌素 A (**Concentricolide A**)；抗 HIV 阳性药物为逆转录酶抑制剂 AZT 及结合与融合抑制剂 T20。

细胞和病毒

C8166 和 **HIV-1_{IMB}/H9** (慢) 均由英国 MRC, AIDS Reagent Project 惠赠。细胞和病毒均按常规方法冻存和复苏。

实验例 1

炭球菌素 A (Concentricolide A) 对 C8166 的细胞毒性检测

C8166 为 HIV-1 的宿主细胞。 $4 \times 10^5/\text{ml}$ **C8166** 细胞悬液 100ul 与不同浓度的实施例 1 炭球菌素 A 溶液 100ul 混合。37°C, 5%CO₂ 培养 3 天，采用 MTT 法检测细胞毒性。Bio-Tek E1x-800

ELISA Reader 测定 $OD_{595/630\text{ nm}}$ 值。CC₅₀ 值（50% 细胞毒浓度）计算如下：细胞存活率 (%) = (试验孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (正常细胞对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) × 100。结果见图 1 和图 2。

实验例 2

炭球菌素 A (Concentricolide A) 对正常细胞与 HIV 慢性感染细胞融合 (Fusion) 的阻断试验

HIV 感染细胞与正常 T 细胞共培养时，感染细胞膜表面的 HIVgp120 糖蛋白与正常细胞膜表面的 CD4 分子结合，致使细胞融合，形成合胞体细胞。作用于该位点的化合物就可抑制合胞体的形成。因此，该方法用于观察化合物是否作用于病毒与宿主细胞结合和融合这一靶点。在 96 孔细胞培养板上，将实施例 1 炭球菌素 A 5 倍稀释，每个梯度 3 个重复孔，每孔 100μl。同时设置不含化合物的阴性对照孔及 T-20 阳性药物对照孔。每孔滴加 $6 \times 10^5/\text{ml}$ 对数生长期的 C8166 细胞 50μl 和 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的 HIV-1 慢性感染的 H9 细胞 50μl。37°C, 5%CO₂ 培养 24 小时，在显微镜下观察细胞融合形成合胞体的情况来推断炭球菌素是否阻断病毒与细胞的结合过程。结果见图 3 和图 4。

实验例 3

炭球菌素 A 对 HIV-1 感染 C8166 致细胞病变 (CPE) 的抑制作用

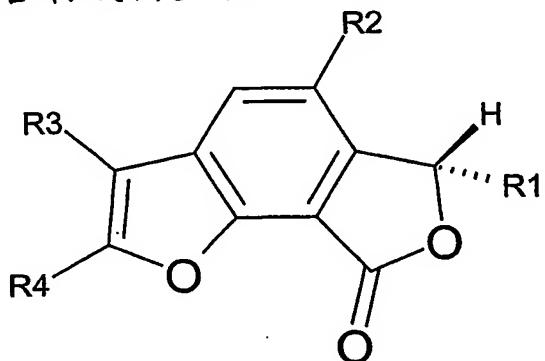
100 μl 含有相应浓度实施例 1 炭球菌素的培养液, 加入 C8166 细胞($4 \times 10^5/\text{ml}$)及 HIV-1_{III B}, M.O.I 为 0.06, 最终体积为 200 μl 。同时设置 AZT 阳性药物对照。37°C, 5% CO₂, 培养 3 天, 倒置显微镜下计数合胞体的形成。EC₅₀ (50% Effective Concentration) 为抑制合胞体形成 50% 时的化合物浓度。致细胞病变 (CPE) 抑制率 (%) = (1-试验孔合胞体数/对照孔合胞体数) × 100。结果见图 5 和图 6。

结论

研究结果表明, 炭球菌素 (Conenticolide) 的细胞毒性低, 具有显著的体外抗 HIV-1 活性。选择指数 S.I.=222。作用靶点可能是作用于 HIV-1 结合和进入细胞, 作为作用于病毒与细胞结合和融合靶点的小分子化合物具有十分重要的意义。

权 利 要 求

1. 通式 I 化合物或衍生物



(I)

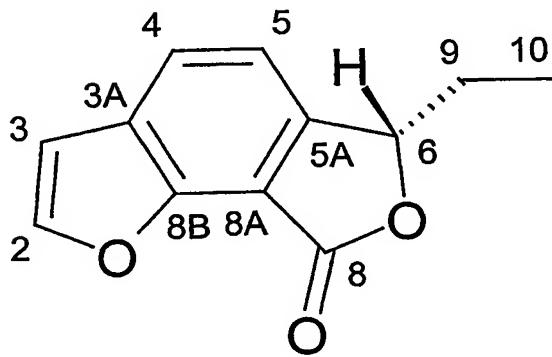
R1 代表 C_1-C_4 烷基,

R2 代表 H、卤素、-OH、 NRR' 或 $-NO_2$, 其中 R 和 R' 代表 H、或 C_1-C_6 烷基,

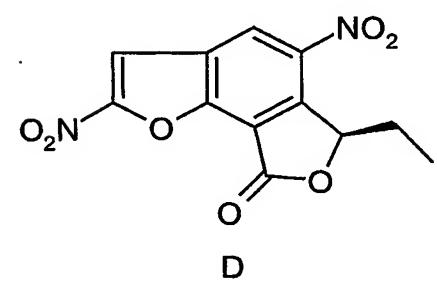
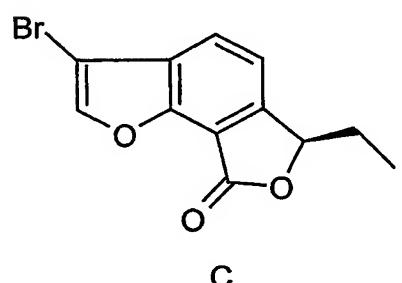
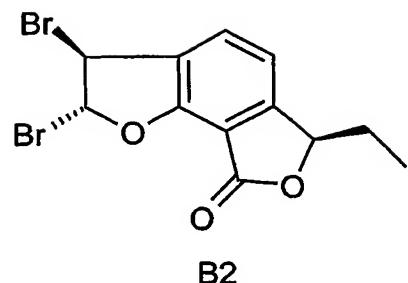
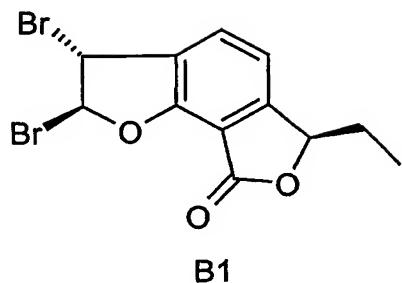
R3 代表 H、卤素、-OH、 NRR' 或 $-NO_2$, 其中 R 和 R' 代表 H、或 C_1-C_6 烷基,

R4 代表 H、卤素或 $-NO_2$.

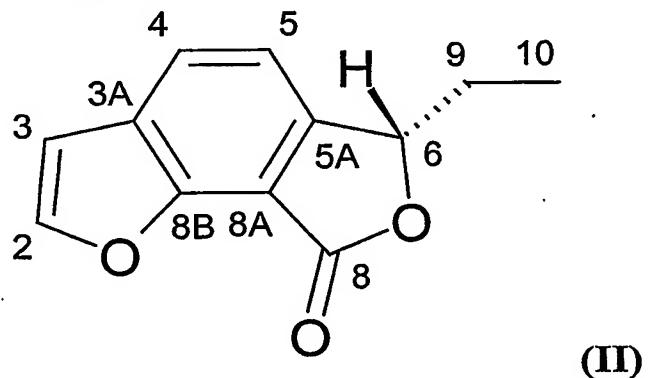
2. 权利要求 1 的化合物, 其选自下面通式代表的化合物:



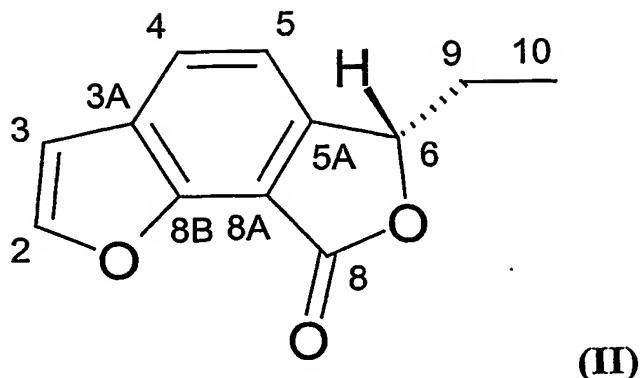
(II)



3. 权利要求 1 或 2 的化合物，其选自式 II 化合物



4. 一种提取物，其含有式 II 化合物

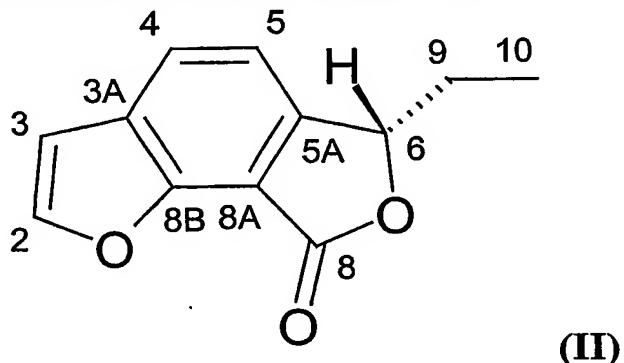


5. 一种药物组合物，其包括权利要求 1-3 任一的化合物或其衍生物或权利要求 4 的提取物及药用载体或赋形剂。

6. 通式 I 化合物的制备方法，其包括

a. 以云南高等真菌炭球菌 (*Daldinia concentrica*) 子实体或其发酵液为原料，用有机溶剂提取；

b. 将 a 中提取物用硅胶层析分离，得式 III 化合物；

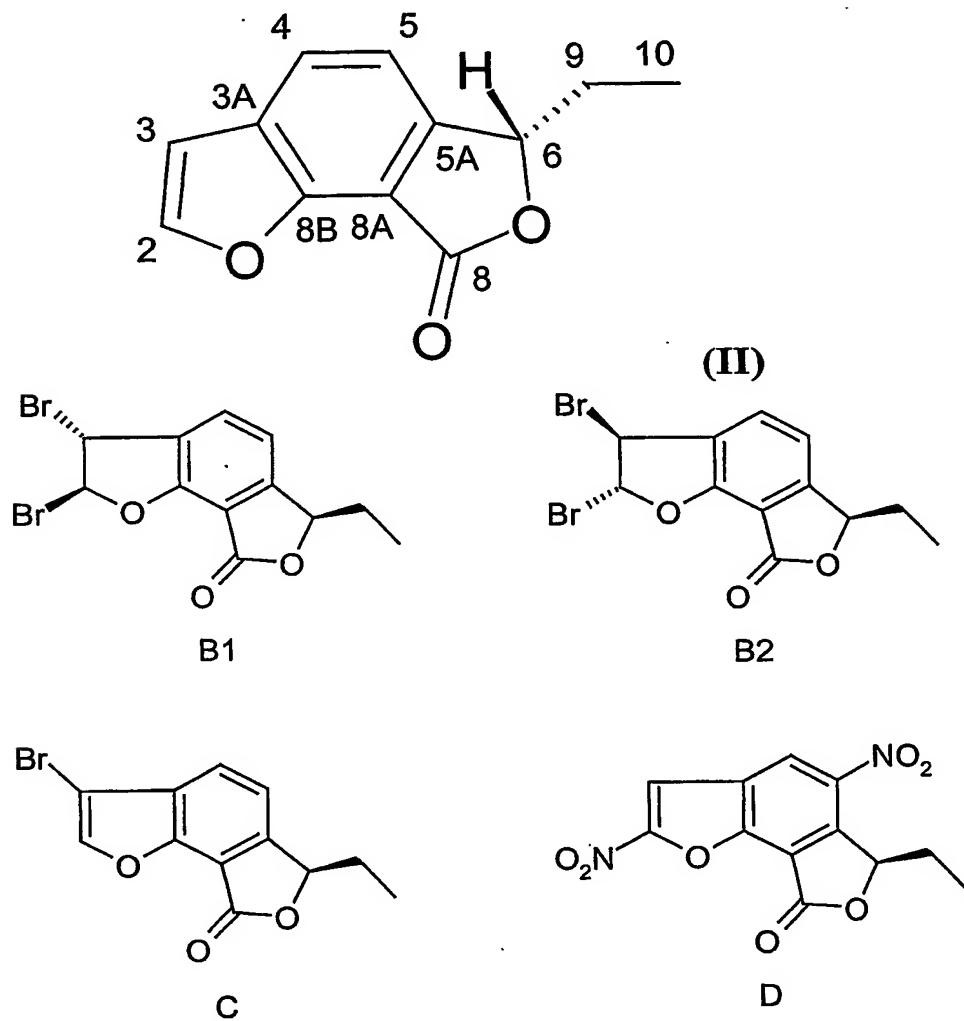


c. 将式 II 化合物通过溴化，硝化或烷基化反应，得式 I 化合物。

7. 权利要求 1-3 任一要求的化合物在制备用于预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的药物中用途。

8. 权利要求 4 的提取物在制备用于预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的药物中用途。

9. 权利要求 5 的组合物，其中所述化合物选自



10. 预防和/或治疗与 HIV 感染有关症状或疾病的方法，其包括将权利要求 1-3 任一的化合物或权利要求 4 的提取物给予 HIV 感染的患者。

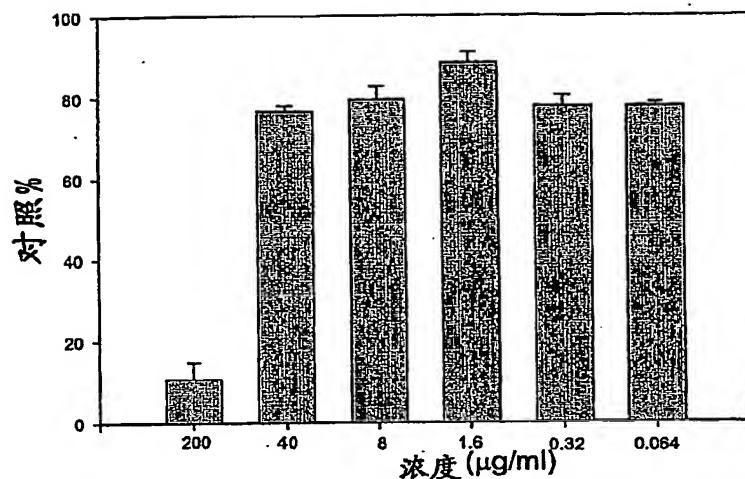


Fig. 1

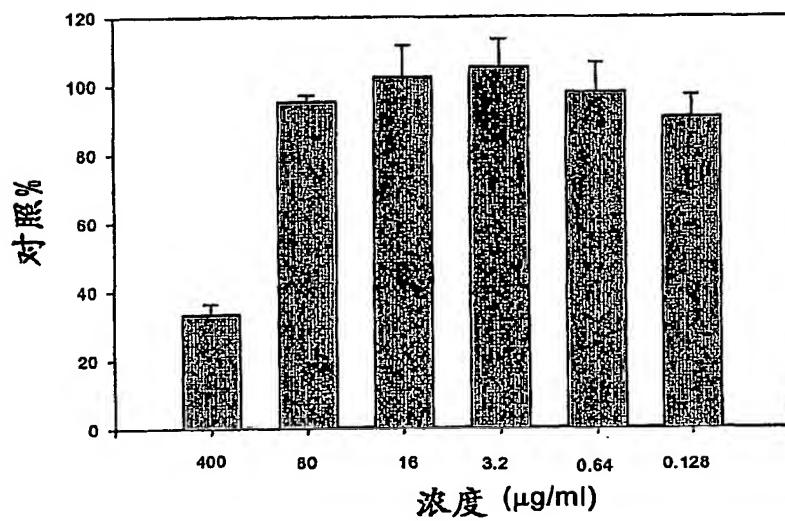


Fig. 2

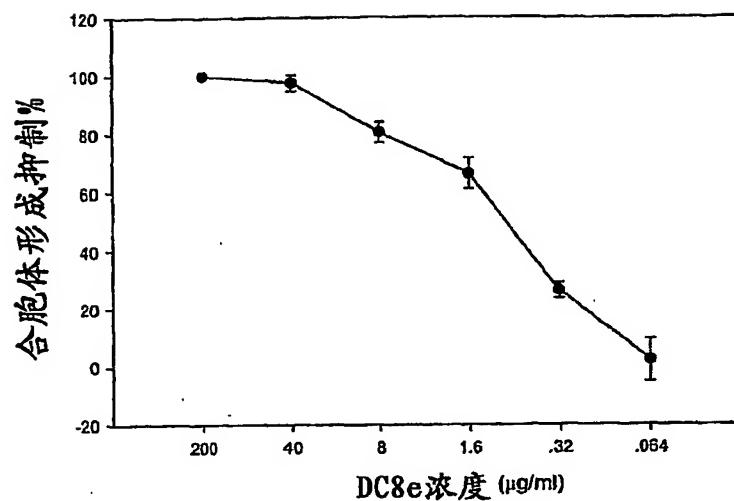


Fig. 3

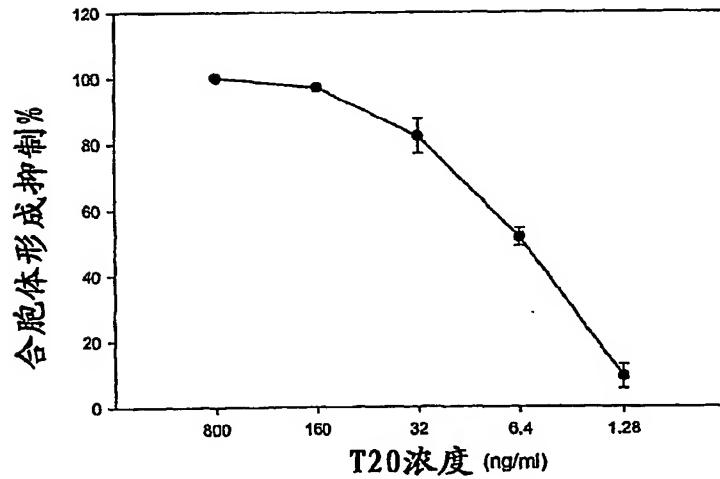


Fig. 4

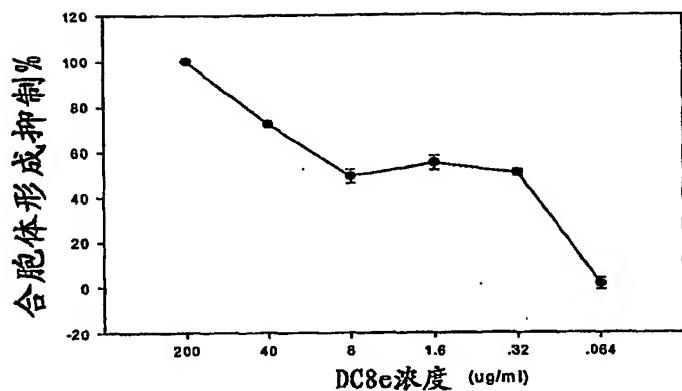


Fig. 5

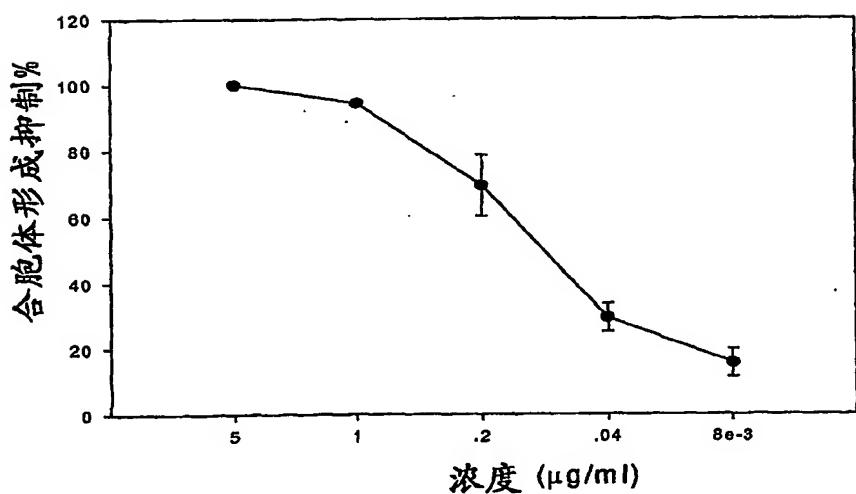


Fig. 6

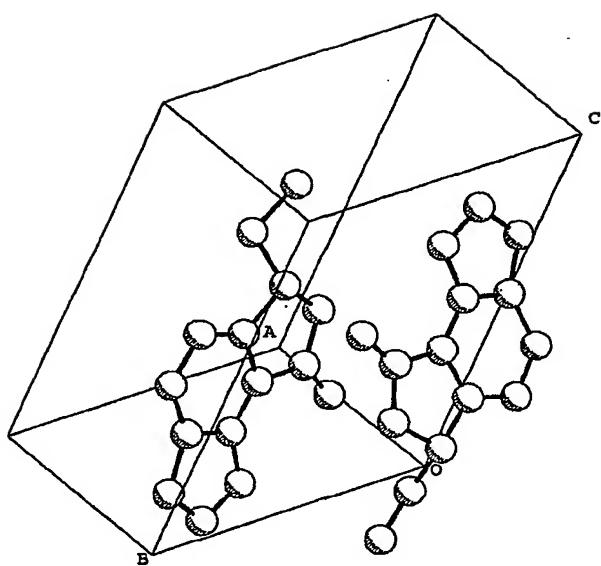


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/001188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C' C07D493/04, A61K 31/365, A61P 31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C' C07D493/00, C07D493/02, C07D493/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chemical Abstracts 124:170144, &Buchanan, Malcolm S et al., Phytochemistry,1996, Vol. 41, No. 3, p.821-8	1-9
A	Chemical Abstracts 124:312276, &Buchanan, Malcolm S et al., Phytochemistry,1996, Vol. 41, No. 1, p.173-6	1-9
A	Chemical Abstracts 123:250780, &Buchanan, Malcolm et al., Phytochemistry,1995, Vol. 40, No. 1, p.135-40	1-9
A	Chemical Abstracts 122:128214, &Hashimoto, Toshihiro et al., Chem. Pharm. Bull,1994, Vol. 42, No. 7, p.1528-30	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27. Dec. 2004 (27.12.2004)

Date of mailing of the international search report

27. JAN 2004 (27.01.2004)

Name and mailing address of the ISA/
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China

Authorized officer

Facsimile No. 86-10-62019451

Telephone No. (86-10)62085562



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/001188

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in Claim 10 relates to a method for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001188

A. 主题的分类

Int. C⁷ C07D493/04, A61K 31/365, A61P 31/18

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

Int. C⁷ C07D493/00, C07D493/02, C07D493/04

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	美国化学文摘 124:170144, & Buchanan, Malcolm S et al., Phytochemistry, 1996 年, 第 41 卷, 第 3 期, 821-8 页	1-9
A	美国化学文摘 124:312276, & Buchanan, Malcolm S et al., Phytochemistry, 1996 年, 第 41 卷, 第 1 期, 173-6 页	1-9
A	美国化学文摘 123:250780, & Buchanan, Malcolm et al., Phytochemistry, 1995 年, 第 40 卷, 第 1 期, 135-40 页	1-9
A	美国化学文摘 122:128214, & Hashimoto, Toshihiro et al., Chem. Pharm. Bull, 1994 年, 第 42 卷, 第 7 期, 1528-30 页	1-9

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了
理解发明之理论或原理的在后文件“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的
发明不是新颖的或不具有创造性“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

27.12月 2004 (27.12.2004)

国际检索报告邮寄日期

27.1月 2005 (27.01.2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

电话号码: (86-10)62085562



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001188

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 10

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求 10 涉及对人体的治疗的治疗方法

2. 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

3. 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

支付附加检索费时未提交异议书。